

(様式 16)

2014 年 3 月 25 日

学 位 論 文 の 内 容 の 要 約

氏 名	富成 司
学位の種類	博士（生命科学）
学府又は研究科・専攻	大学院生物システム応用科学府 共同先進健康科学専攻
指導を受けた大学	東京農工大学
学位論文題目	骨系統疾患に対するポリメトキシフラボノイドを用いた作用の研究

【論文の内容の要約】

【第一章 諸言】

高齢化および食の多様化が進んだ日本社会において、骨系統疾患である骨粗鬆症や歯周病の患者数は非常に多く、Quality of Life (QOL) の低下が問題視されている。骨粗鬆症患者の 70% 以上は女性であり、これは閉経による女性ホルモンの減少が原因となっている。閉経後骨粗鬆症は、全身の骨量が減少し、骨折リスクを増大させる。歯周病は、歯周病原性細菌の感染により引き起こされる炎症性の骨減少性疾患である。歯周病による歯槽骨量の低下は、歯の喪失に繋がる。骨量は、破骨細胞による骨破壊および骨芽細胞による骨形成のバランスにより一定に保たれている（骨のリモデリング）。骨破壊と骨形成は、ホルモンや炎症誘起物質など様々な因子による調節を受けており、相対的に骨破壊量が骨形成量を上回る事で、骨量が低下する骨疾患の発症につながる。これまでに当研究室において、interleukin (IL)-1 や lipopolysaccharide (LPS) といった炎症惹起物質は、骨芽細胞に作用する事で、炎症性メディエーターである prostaglandin E₂ (PGE₂) 合成経路に関与する cyclooxygenase (COX)-2 や membrane-bound PGE synthase (mPGES)-1 といった酵素の発現を亢進させ、PGE₂ 産生を誘導する事を明らかにした。PGE₂ は、自己分泌および傍分泌により、骨芽細胞に作用する事で、破骨細胞分化に必須の因子である receptor activator of NF-κB ligand (RANKL) の発現を亢進させる。RANKL は、単球・マクロファージ系細胞が発現している RANK に結合し、破骨細胞への分化・融合を誘導する。その結果、破骨細胞による骨破壊が誘導され、骨粗鬆症や歯周病といった骨量減少を特徴とする骨系統疾患に至る。

フラボノイドとは、植物・果実に含まれる色素の総称である。近年、カテキンやイソフラボンといったフラボノイドは、強い抗酸化作用を持つ事が示され、生活習慣病の予防に有用であると注目されている。ポリメトキシフラボノイド (PMF) は、多数のメトキシ基 (–OCH₃) を有するフラボノイドである。代表的な PMF として、シークワサー等の柑橘類に多く含まれるノビレチンおよびタンゲレチンが知られており、これまでに抗がん作用、脂質代謝改善作用、抗酸化作用、抗メタボリックシンドローム作用といった様々な効果が報告されている。しかし、PMF の骨代謝に対する作用は未だ明らかになっていない。

本研究では、代表的な骨疾患である閉経後骨粗鬆症および歯周病に着目し、PMF である nobiletin および tangeretin の予防因子としての可能性を検討した。

【第二章 閉経後骨粗鬆症に対する PMF の効果】

閉経後骨粗鬆症とは、女性ホルモンであるエストロゲンの欠乏により全身の骨量が著しく減少する疾患である。エストロゲン欠乏は、IL-1 等の炎症性サイトカイン分泌を促進する事が報告さ

れている。そこで、IL-1 誘導性の骨破壊に対する nobiletin の効果を検討した。まず、マウス骨芽細胞および骨髄細胞を IL-1 および nobiletin 存在下において、共存培養した。分化した破骨細胞は、破骨細胞特異的マーカー酵素である tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) 染色を行い、TRAP 陽性多核破骨細胞数を計測した。また、培養後に、培養上清中の PGE₂ 量を測定した。その結果、IL-1 誘導性の破骨細胞分化および PGE₂ 産生は、nobiletin 処理により抑制された。そこで、PGE₂ 合成に関与する因子である COX-2 の発現解析を行った。骨芽細胞に IL-1 および nobiletin 存在下にて、3 時間および 12 時間培養し、その後細胞から RNA を単離した。単離した RNA を用いて、ノーザンブロット法により COX-2 mRNA 発現の解析を行った。その結果、IL-1 誘導性の COX-2 発現は、nobiletin により抑制された。IL-1 は、inhibitory κ B kinase (IKK) 依存的な転写因子 NF- κ B 活性化を介し、COX-2 mRNA 発現を増強する。そこで、IKK 活性および NF- κ B 活性に対する nobiletin の作用を検討した。NF- κ B 活性をルシフェラーゼアッセイにより解析した結果、IL-1 により誘導された NF- κ B 活性は、nobiletin により抑制された。またゲルシフトアッセイを行い、NF- κ B と DNA の結合活性について検討した結果、nobiletin は IL-1 誘導性の NF- κ B および DNA の結合を抑制する事が示された。さらに、IKK 活性を nobiletin は抑制する事が明らかとなった。これらの結果より、nobiletin は骨芽細胞において、IL-1 シグナル伝達における IKK-依存的な NF- κ B 活性化経路を抑制する事で、COX-2 および PGE₂ 産生を抑制する事が示された。次に、マウスに卵巣摘出手術を施し、閉経後骨粗鬆症モデルマウスを作製した。術後より 4 週間、nobiletin の腹腔内投与を連日行った。その後、マウスより大腿骨を摘出し、大腿骨遠位部の μ -CT 解析および DXA 法による骨密度測定を行った。その結果、エストロゲン欠乏性の大腿骨量の減少に対して、PMF が抑制作用を発揮する事が明らかとなった。以上の結果から、PMF は閉経後骨粗鬆症の予防因子となりうる事が示唆された。

【第三章 歯周病に対する PMF の効果】

歯周病とは、グラム陰性細菌外膜成分である LPS により引き起こされる炎症性の骨系統疾患である。そこで、LPS に対する nobiletin および tangeretin の効果を検討した。まず、LPS および nobiletin もしくは tangeretin 存在下において、マウス骨芽細胞および骨髄細胞の共存培養を行った。培養後、TRAP 染色を行い、TRAP 陽性多核破骨細胞数を計測した。また、培養上清中の PGE₂ 量を測定した。その結果、LPS 誘導性の破骨細胞分化および PGE₂ 産生は、nobiletin および tangeretin 処理により抑制された。また、マクロファージ系細胞株である RAW264.7 細胞を、可溶性 RANKL および nobiletin もしくは tangeretin 存在下にて、単独培養を行った。その結果、RANKL 誘導性破骨細胞分化を、nobiletin および tangeretin は抑制する事が示された。続いて、マウスより下顎歯槽骨を採取および抜歯を行い、歯槽骨器官培養を行った。その結果、LPS 誘導性の骨吸収活性は、nobiletin および tangeretin 処理により抑制された。さらに、マウスの下顎歯肉に LPS および nobiletin または tangeretin の局所投与を行い、in vivo における LPS 誘導性骨破壊に対する nobiletin および tangeretin の効果を検討した。その結果、LPS 誘導性の歯槽骨破壊に対し、nobiletin および tangeretin は抑制作用を示した。これらの結果から、nobiletin および tangeretin は、LPS 誘導性の PGE₂ 産生を抑制する事で破骨細胞分化および骨吸収活性を抑制する事が明らかとなった。さらに、歯周病の予防因子としての可能性が示唆された。

【第四章 結論・考察】

フラボノイド等の天然由来化合物は、様々な生理活性を持つ事から、生活習慣病の予防因子として注目されている。PMF は、メトキシ基を多数持つフラボノイドであり、シークワサーに多量に含まれている事が知られている。本論文では、閉経後骨粗鬆症および歯周病に焦点を当て、こ

れら疾患に対する PMF の予防因子としての可能性を検討した。In vitro において、PMF は IL-1 または LPS により誘導される破骨細胞分化および PGE₂ 産生を抑制する事が示された。さらに、PMF は、IKK- NFκB 依存的な COX-2 発現を抑制する事が明らかとなった。閉経後骨粗鬆症に対する効果では、閉経後骨粗鬆症モデルマウスの大腿骨量に対して、PMF は有効な効果を示した。以上の結果から、PMF の骨破壊抑制作用メカニズムの 1 つとして、エストロゲン欠乏により誘導される炎症性サイトカインによる PGE₂ 依存的な骨破壊の抑制である可能性を示唆した。歯周病に対する検討では、PMF は、LPS 誘導性の破骨細胞分化および PGE₂ 産生を抑制し、骨吸収活性を抑える事が示された。さらに、歯周病モデルマウスにおける LPS 誘導性の歯槽骨破壊を、PMF は抑制する事が明らかとなった。これらの結果より、日々の生活において、PMF を多量に含む柑橘類の摂食やサプリメントの摂取する事は、これら骨疾患による骨量減少や炎症の予防に繋がる事が示唆された。